

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15753

研究課題名（和文）ガレクチン-9の膵癌細胞抑制機構に関連するエクソソームmicroRNA

研究課題名（英文）Exosome microRNA related to anti-tumor effect in pancreas cancer of galectin-9

研究代表者

坂本 鉄平（sakamoto, teppei）

香川大学・医学部・協力研究員

研究者番号：30769328

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：Gal-9濃度依存的に膵癌細胞(PK1,9)増殖抑制効果を認めた。また、膵癌細胞に対し、Gal-9は、アポトーシスの誘導が生じていることを証明した。さらにGal-9の膵癌に対する抗腫瘍効果に関連するマイクロRNAは、2555分子のmiRNAのうち、有意な差をもって($p<0.05$)癌細胞内に上昇したmiRNAは13分子、減少したmiRNAは6分子が候補分子であった。癌細胞内(PK-1)で減少していたmiR-301は、エクソソーム内で増加していた。PK-1にmiR-301を遺伝子導入すると細胞の浸潤能が増強した。よって、miR-301は、膵癌の進展抑制の標的分子となりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医学分野におけるエクソソーム内のマイクロRNAの研究は、今始まったばかりである。難治癌である膵癌のマイクロRNA、エクソソーム内のマイクロRNAの網羅的な発現プロファイリングを作成することは、発癌機序、予後予測、創薬などの新たな治療法開発の手がかりとなることが期待される。さらに、マイクロRNAの研究は、将来的には、癌のみならず、さまざまな疾病の診断、治療、創薬開発を目指したバイオ産業の基盤技術となる可能性を秘めている。Gal-9の抗癌作用に関連するエクソソーム内のmicroRNAを同定するならば、エクソソームをターゲットとした新たな治療法の開発の手がかりとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Galectin-9 (Gal-9) demonstrated to inhibit cell proliferation two types of pancreatic cancer cell lines, PK-1 and PK-9 cancer cell lines, at Gal-9 dose-dependent manner. The effect was acknowledged. Moreover, it was demonstrated that Gal-9, induces apoptosis in pancreatic cancer cells. Furthermore, in order to identify microRNAs related to the antitumor effect of Gal-9 on pancreatic cancer, PK-1 was elevated in cancer cells with significant difference after administration of galectin-9 among 2555 miRNAs. The up-regulated miRNAs was 13 and the down-regulated miRNAs was 6 miRNAs. MiR-301, which was decreased in cancer cells (PK-1), was increased in exosomes. As a functional analysis, transfection of PK-1 enhanced the invasion ability of cancer cells. Therefore, miR-301 can be a target molecule for suppressing the progression of pancreatic cancer.

研究分野：消化器内科

キーワード：ガレクチン-9 膵臓癌 マイクロRNA エクソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々が、見出した新しい生理活性物質ガレクチン-9(Gal-9)は、さまざまな消化器癌の Gal-9 の転腫瘍効果の確認と Gal-9 によって誘導されたエクソソームの抗腫瘍効果に関連する microRNA と同定し、その機能解析を行う。

2. 研究の目的

Gal-9 が、膵臓癌に対して、抗腫瘍効果があり、その機構として Gal-9 が腫瘍細胞内・組織内の microRNA を変化させることにより、抗癌作用を有することを証明してきた。本研究の目的は、Gal-9 による膵臓癌の抗腫瘍効果が、腫瘍内の microRNA だけではなく、癌細胞からの放出されたエクソソーム(細胞外分泌小胞)内の microRNA にも変化を及ぼし、その microRNA 分子もまた、抗腫瘍活性を持つ可能性について検討をする。そして Gal-9 が、新たな癌抑制機構のエクソソームを標的とした治療戦略に成り得る可能性についての基礎研究を行うことである。

3. 研究の方法

(1) Gal-9 添加および非添加の細胞培養液中のエクソソームの単離：膵癌細胞株は PK-1, PK-9 を用いる。それぞれの培養細胞を 150mm のディッシュで細胞培養を行い、50%になるまで培養を行う。培養上清を除き、PBS で洗浄する。無血清培地 (Advanced DMEM, ライフテクノロジー, 本課題研究で申請) を加え、0.3 μ M の Gal-9 の添加、非添加群において、24 時間、48 時間後の培養液からエクソソームを単離する。単離されたエクソソーム溶液を miRNeasy Mini Kit(キアゲン社)で small RNA を含む total RNA として抽出する。これらの RNA の品質は、Agilent 2100 バイオアナライザー(当教室に保有)により評価検討する。

(2) 膵癌細胞株における Gal-9 の非添加、添加の培養液中の microRNA 的解析：膵癌細胞株の培養液からエクソソーム由来のマイクロ RNA を回収し miRNeasy Mini Kit(キアゲン社, 本課題研究で申請)、これをアレイ用のサンプルとする。2565 種類の microRNA を搭載したアレイ(東レ, 本課題研究で申請)に、標識 (Ambion 社, mirVana™ miRNA labeling kit, 本課題研究で申請) したサンプルをオリゴチップ(東レ, Human miRNA Oligo 4 arrays ver.21, 本課題研究で申請)にハイブリダイゼーション後、アレイ用スキャナー(当消化器内科保有)でスキャンを行い、Gal-9 のがん細胞抑制に関連するエクソソーム microRNA を同定する。

(3) Gal-9 の投与により、膵癌細胞株のエクソソーム内に特異的に発現増強、減弱するマイクロ RNA のターゲット遺伝子の機能解析：Gal-9 添加において癌抑制効果に関連すると予測された microRNA をリポソーム法によりその合成 microRNA 前駆体分子(Pre-miR™ MmRNA Precursor Molecules, Ambion 社, 本課題研究で申請)あるいは、microRNA 活性を下げる合成 microRNA 阻害分子(Anti-miR™ MmRNA inhibitors Ambion 社, 本課題研究で申請)を癌細胞内に導入し、細胞増殖能、アポトーシスの誘導を観察し、癌細胞抑制効果に関連するエクソソーム microRNA の機能解析を行う。

4. 研究成果

まず、2 種の膵癌細胞株 PK-1 と PK-9 に種々の濃度の Gal-9 投与し、cell proliferation assay をを行い、癌細胞増殖について検討した。PK-1、PK-9 共に濃度依存的に増殖抑制効果を認めた。また、アポトーシスの誘導を caspase cleaved keratin18 を測定することによ

り検討し、Gal-9によりアポトーシスの誘導が生じていることを証明した。さらにGal-9の膵癌に対する抗腫瘍効果に関連するmicroRNAを同定する目的でPK-1において、2555分子のmicroRNAのうち、Gal-9投与後に有意な差をもって($p < 0.05$)癌細胞内に上昇したmicroRNAは13分子、減少したmicroRNAは6分子であった。癌細胞内(PK-1)で減少していたmiR-301は、エクソソーム内で増加していた。機能解析としてPK-1にmiR-301を遺伝子導入すると細胞の浸潤能が増強した。よって、miR-301は、膵癌の進展抑制の標的分子となりうる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okura R, Fujihara S, Iwama H, Morishita A, Chiyo T, Watanabe M, Hirose K, Kobayashi K, Fujimori T, Kato K, Kamada H, Kobara H, Mori H, Niki T, Hirashima M, Okano K, Suzuki Y, Masaki T.	4. 巻 15 (1)
2. 論文標題 MicroRNA profiles during galectin-9-induced apoptosis of pancreatic cancer cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Lett	6. 最初と最後の頁 407-414
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2017.7316	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----